



(19) **UA** (11) **60 238** (13) **A**  
(51)МПК <sup>7</sup> **A 01N 1/00**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ДЕКЛАРАЦИОННОМУ ПАТЕНТУ УКРАИНЫ**

(21), (22) Заявка: 2003054944, 29.05.2003

(24) Дата начала действия патента: 15.09.2003

(46) Дата публикации: 15.09.2003

(72) Изобретатель:

Лобинцева Галина Степановна, UA,  
Гладких Юрий Васильевич, UA,  
Лобинцев Дмитрий Валерьевич, UA,  
Гладких Владимир Юрьевич, UA

(73) Патентовладелец:

Лобинцева Галина Степановна, UA,  
Гладких Юрий Васильевич, UA,  
Лобинцев Дмитрий Валерьевич, UA,  
Гладких Владимир Юрьевич, UA

**(54) СОСТАВ КРИОКОНСЕРВАНТА ДЛЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДОНОРСКОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ (ВАРИАНТЫ)**

(57) Реферат:

Состав криоконсерванта для гемопоэтических клеток донорской кордовой крови предусматривает применение водного раствора хлорида натрия, в качестве сахара он содержит полиглюкин, димексид (полиэтиленоксид) в качестве криопротектора и лизоцим.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2003, N 9, 15.09.2003. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 6 0 2 3 8 A

U A 6 0 2 3 8 A



(19) **UA** (11) **60 238** (13) **A**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 01N 1/00**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF  
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL  
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF DECLARATIVE PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2003054944, 29.05.2003  
(24) Effective date for property rights: 15.09.2003  
(46) Publication date: 15.09.2003

(72) Inventor:  
Lobintseva Halyna Stepanivna, UA,  
Hladkykh Yurii Vasyliovych, UA,  
Lobintsev Dmytro Valeriiovych, UA,  
Hladkykh Volodymyr Yuriiovych, UA

(73) Proprietor:  
Lobintseva Halyna Stepanivna, UA,  
Hladkykh Yurii Vasyliovych, UA,  
Lobintsev Dmytro Valeriiovych, UA,  
Hladkykh Volodymyr Yuriiovych, UA

(54) **COMPOSITION OF A CRYOCONSERVING AGENT FOR HEMATOPOIETIC CELLS OF DONOR CORD BLOOD (VARIANTS)**

(57) Abstract:

A composition of a cryoconserving agent for haematopoietic cells of donor cord blood envisages using aqueous solution of sodium chloride, as sugar, it contains polyglucine, dimexide (polyethylene oxide) as a cryoprotector and lysozime.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2003, N 9, 15.09.2003. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 6 0 2 3 8 A

U A 6 0 2 3 8 A



(19) **UA** (11) **60 238** (13) **A**  
(51)МПК <sup>7</sup> **A 01N 1/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:  
2003054944, 29.05.2003

(24) Дата набуття чинності: 15.09.2003

(46) Публікація відомостей про видачу патенту  
(декларційного патенту): 15.09.2003

(72) Винахідник(и):

Лобинцева Галина Степанівна, UA,  
Гладких Юрій Васильович, UA,  
Лобинцев Дмитро Валерійович, UA,  
Гладких Володимир Юрійович, UA

(73) Власник(и):

Лобинцева Галина Степанівна, UA,  
Гладких Юрій Васильович, UA,  
Лобинцев Дмитро Валерійович, UA,  
Гладких Володимир Юрійович, UA

(54) СКЛАД КРІОКОНСЕРВАНТУ ДЛЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ДОНОРСЬКОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ  
(ВАРІАНТИ)

(57) Реферат:

Склад кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові передбачає

застосування водного розчину хлориду натрію, як цукор він містить поліглюкін, димексид (поліетиленоксид) як кріопротектор та лізоцим.

U A 6 0 2 3 8 A

U A 6 0 2 3 8 A

## Опис винаходу

Склад криоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, його варіанти.

Винахід відноситься до біології та медицині і може бути використаний для криоконсервування гемопоетичних клітин донорської кордової крові людини.

Відомий склад криоконсерванту (дивись спосіб консервації еритроцитів, патент Росії №2051580, МПК: А01 N1/02, А61 К35/18, дата публікації: 1996.01.10) який передбачає використання для криоконсервування водного розчину пропиленгліколю, сахарози та хлористого натрію у бідистильованій воді.

Криоконсервант такого складу має обмежену сферу застосування і може використовуватися лише для заморожування клітин, які не мають ядра (як еритроцити). Такий криоконсервант передбачає застосування великої швидкості заморожування і не може застосовуватися для клітин, що мають ядра і консервуються з низькою швидкістю охолодження бо обезвожує клітину.

Відомий склад криоконсерванту (дивись Спосіб криоконсервування кровотворних клітин кордової крові, патент України №31847 МПК 6 А01 N1/02 А, дата публікації: 15.12.2000, номер бюлетеня: 7) який передбачає використання для криоконсервування гемопоетичних клітин кордової крові людини водного розчину Декстрану-60 (декстрану молекулярної маси 60000) в концентрації 1,2%.

Криоконсервант такого спрощеного складу не може забезпечити збереження життєздатності клітин при криоконсервуванні тому, що він не зв'яже необхідну кількість води і не забезпечує необхідну структуру льоду, великі кристали якого пошкоджують мембрани клітин.

Відомий склад криоконсерванту (дивись Спосіб криоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, патент України №30014 МПК А01 N1/02, А61 К35/14, дата публікації: 15.11.2000, номер бюлетеня: 6) який передбачає використання для криоконсервування гемопоетичних клітин кордової крові людини водного розчину низькомолекулярного полівінілпіролідону, глюкози та лактози у співвідношенні компонентів розчину об. %:

низькомолекулярний полівінілпіролідон	17-20
глюкоза	10-11
лактоза	4-5
вода	до 100

При цьому як сольовий розчин полівінілпіролідону використовують водний розчин низькомолекулярного полівінілпіролідону, натрію хлориду, калію хлориду, кальцію хлориду, магнію хлориду, натрію гідрокарбонату у співвідношенні об. %:

низькомолекулярний полівінілпіролідон	6-6,5
натрію хлорид	0,50-0,55
калію хлорид	0,04-0,045
кальцію хлорид	0,05-0,001
магнію хлорид	0,0005-0,001
натрію гідрокарбонату	0,023-0,025
вода	до 100

(Точно такий склад криоконсерванту передбачено також у патенті України №42599 МПК А01 N1/00, А01 N1/02 В, А61 К35/14, дата публікації: 15.10.2001, номер бюлетеня 9).

Використання низькомолекулярних сахарів у складі криоконсерванту призводить до певних проблем. Низькомолекулярні сахари мають можливість проникати через кліткову мембрану у клітини і при розморожуванні, внаслідок вирівнювання градієнту концентрації позакліткова вода буде проникати у клітку. Внаслідок перевищення кількості води усередині клітині її мембрана може пошкоджуватися.

Такий криоконсервант передбачає застосування в своєму складі великої різноманітності та кількості сілі. Перевищення різноманітності та кількості сілі в розчині один з механізмів пошкодження клітин при замороженні. Внаслідок заморожування, в просторі між кристалами льоду (тобто в міжклітинному просторі) їх концентрація підвищується. Це призводить до кризи клітин, які з знаходяться у цьому просторі.

Полівінілпіролідон, внаслідок його низької проникності у клітину менш ефективний криопротектор і відповідно не забезпечує достатнього захисту внутрікліткових компонентів.

Завданням винаходу є створення складу криоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові у якому шляхом зміни знайдених емпіричним шляхом інгредієнтів, та їх вмісту в складі криоконсерванту, забезпечується покращання умів збереження клітин донорської кордової крові, збільшення періоду збереження та підвищення кількості життєздатних клітин кордової крові після періоду збереження.

Для вирішення цього завдання криоконсервант для гемопоетичних клітин донорської кордової крові передбачає застосування в своєму складі водного розчину Хлориду натрію, сахарив та криопротектора.

Новим у складі криоконсерванту є те, що у якості сахарив він містить поліглюкин, у якості криопротектора димексид та додатково лизоцим у співвідношенні компонентів розчину об. %:

поліглюкин 6% рН4,5-6,0	40-45
хлорид натрію	8-9

лізоцим	0,04-0,05
дімексид	4-6
вода бідистільована	решта.

5 В іншому варіанті виконання кріоконсерванта для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, новим у складі кріоконсерванту є те, що у якості сахарив він містить поліглюкин, у якості кріопротектора поліетиленоксид м.м.400 та додатково лізоцим у співвідношенні компонентів розчину об. %:

10	поліглюкин 6% рН4,5-6,0	40-45
	хлорид натрію	8-9
	лізоцим	0,04-0,05
	поліетиленоксид м.м.400	10-20
	вода бідистільована	решта

15 Проведені досліді показують, що успіх кріоконсервування визначається не тільки оптимальною технологією заморожування, а також складом речовин оточення в якому охолоджується об'єкт.

Склад запропонованого кріоконсерванту забезпечує оптимальну проникність кріопротектору у клітину в зв'язку з чим забезпечується достатній захист внутрікліткових компонентів.

20 Хлорид натрію, у запропонованій кількості забезпечує підтримання допустимих границь коливання осмотичного тиску у внутрі та поза клітинами. Дія хлористого натрію складається в зниженні градієнту осмотичного тиску при переході кріопротектора з середі в клітину і в зворотному напрямку, що запобігає розриву плазматичної мембрани в процесі заморожування - відігріву.

Наявність поліглюкину забезпечує нормалізацію осмотичного градієнту в системі.

25 Лізоцим в складі кріоконсерванту володіє бактериолитичною дією, здатністю стимулювати неспецифічну реактивність організму, оказувати противозапальну і муколитичну дію. Крім того, його присутність в розчині стимулює проліферацію стоволових клітин кордової крові.

Для забезпечення корекції концентрації водневих і гідроксильних іонів та для підтримання стабільності рН середі в складі кріопротектору додатково може бути застосований фосфатний буфер.

30 Сутність винаходів що заявляються пояснюється прикладами. Компоненти, використовувані при виготовленні кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові що заявляється, фармакопейної якості і випускаються промисловим шляхом.

Лізоцим (Lysocim) – фермент білкової природи, молекулярна маса 15000, форма випуску : в герметично закоркованих флаконах по 15, 100 і 150мг.

35 Розчин поліетиленоксиду – 400 30% (Solutio Polyethyleneoxydi – 400, 30%). Форма випуску: в скляних пляшка для препаратів крові та кровозамінників по 100, 250, 500мл).

Дімексид (Dimexidum). Концентрат містить 99,0% діметилсульфоксиду концентрат випускають в скляних пляшках оранжевого кольору по 100мл.

Поліглюкін (Реополіглюкин) 6% розчин, форма випуску в скляних пляшках 250 і 500мл.

40 У Таблиці 1 дані приклади конкретного виконання варіантів здійснення складу кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові з зазначенням застосовуваних речовин, а в таблиці 2 якісні характеристики, що досягаються при застосуванні кріоконсервантів одержуваних у цих прикладах.

Спосіб готування кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові в зазначених прикладах здійснювали таким шляхом. Склад кріоконсерванту готували за добу де проведення досліджень.

45 При приготуванні зазначеного в таблиці 1 складу спочатку готували розчин хлориду натрію, перемішували шляхом похитування або на магнітній мішалці колби протягом 5 хвилин. Потім додавали наступний компонент і також перемішували протягом 5 хвилин. Компоненти додавали в такій послідовності. Після розчинення хлориду натрію розчиняли решту солей, потім відповідний до прикладу кріопротектор, цукру та лізоцим.

Підготовка клітин до низькотемпературного консервування.

50 В отриману завісь клітин, що призначені для кріоконсервування, через ін'єкційну голку по краплині додавали такий же об'єм кріоконсерванта відповідно прикладу, при легкому перемішуванні завісі шляхом похитування пробірки. В камері Горяєва підраховували кількість ядерних клітин в препараті.

За допомогою шприцу через ін'єкційну голку клітини розливали по 1мл в поліетиленові кріоампули об'ємом 1-1,8мл фірми Nunc (CryoStore Boxes). Кріоампули герметично зачиняли кришками і маркували.

55 Заморожування гемопоетичних клітин виконували за допомогою програмного заморожувача, який дозволяє варіювати швидкість зниження температури на різних етапах кріоконсервування і автоматично здійснювати ініціювання процесу кристалізації (сідінг) за певної температури. Заморожування здійснювали в три етапи, при цьому на першому етапі з швидкістю 0,7-1,2°C за 1хв. от +20°C до до -8,5-10,5°C, на другому етапі зі швидкістю 1,0-4,5°C/хв. до -30 - -40°C, температурною зупинкою при - 25-30°C 3-5 хв., а на третьому етапі зі швидкістю 10-12°C/хв. до -130-196°C.

60 Розморожування сателіта стерильних і чистих від вірусної і мікоплазмової флори зразків для культивування.

Стерильні та чисті від вірусної і мікоплазмової флори зразки досліджували на біологічну активність методом культивування в напівтвердих середовищах, для підрахунку кількості клітин-попередників та їх проліферативної активності.

65 Розморожування сателіту, призначеного для культивування, виконували таким чином: сателіт вилучали із низькотемпературного банку і розміщували у водяну баню

(плюс 40±0,5°C) на 50-60 сек. до появи рідкої фази (в контейнері плаває крижинка), перенесли в лабораторію для культивування. Контейнер обробляли стерилізуючим розчином і вносили в камеру ламінарного боксу для подальшої роботи.

5 Підрахунок кількості розморожених гемопоетичних клітин.

Стерильним одноразовим 10мл шприцом через ін'єкційну голку клітини переміщували в контейнері і 2 краплини наносили на предметне скло, з яких набирали меланжер до першої позначки, а з клітин, що залишились, робили мазки. В меланжер добирали до кінцевої позначки розчин метиленового синього на 2%-му розчині оцтової кислоти (розведення в 10 разів). Кількість клітин підраховували в камері Горяєва під мікроскопом.

10 Визначення кількості клітин-попередників (КОЕ-ГМ) в розморожених зразках гемопоетичних клітин.

Визначення КОЕ-ГМ в зразках розморожених гемопоетичних клітин виконують шляхом культивування в напівтвердому агарі протягом 7-9 днів за методикою Пайк і Робінсон, 1970 р. з модифікацією, що описана в монографії "Гемопоетичні клітини ембріональної печінки людини (ембріогенез, трансплантація, кріоконсервування)", В.І. Грищенко, Г.С. Лобинцева., І.А. Вотякова, С.І. Шерешков. Київ, 1988.

15 Підрахунок кількості колоній і кластерів здійснювався на постійних препаратах під мікроскопом. Життєздатність розморожених клітин, оцінених за методом клонування, у порівнянні з нативними клітинами не повинна бути менше, ніж 60%.

20 Як видно з результатів дослідів, запропонований склад кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові забезпечує високе збереження клітин-попередниць гемопоеза кордової крові в порівнянні з аналогічними складами кріоконсерванту.

25 Таблица 1  
Склад кріоконсерванту

Приклади	Вода бідитилбована	Натрію хлоридхлорид	Димексин	Поліетиленоксид	Лізоцим	Поліглукінін	Низькомолекулярний олівінілпіролідон	Глюкоза	Лактоза	Калію хлорид	Кальцію хлорид	Магнію хлорид	Натрію гідрокарбонат
прот	66,9	0,5											
1	46,9	8,3	4,8	0	0,05	40							
2	41,1	8,9	5	0	0,05	45							
3	44,8	8,2	6	0	0,04	41							
30 4	42	9	4	0	0,04	45							
5	42,8	8,8	4,4	0	0,05	44							
6	43	8,6	5,4	0	0,04	43							
7	41,3	8,1	5,6	0	0,04	45							
8	45	8,4	4,6	0	0,05	42							
9	41,5	8,5	6	0	0,05	44							
35 10	45,5	8,7	5,8	0	0,04	40							
11	41	9	6	0	0,04	44							
12	43,8	8	5,2	0	0,05	43							
13	32,1	8,9	0	14	0,05	45							
14	36,4	8,6	0	12	0,04	43							
40 15	37	8	0	10	0,05	45							
16	38,2	8,8	0	11	0,04	42							
17	32,8	8,2	0	15	0,05	44							
18	34	9	0	17	0,04	40							
19	33,3	8,7	0	18	0,05	40							
20	31	8	0	20	0,05	41							
45 21	26,7	8,3	0	20	0,04	45							
22	34,6	8,4	0	13	0,04	44							
23	32,5	8,5	0	16	0,05	43							
24	32	9	0	15	0,04	44							

50 Таблица 2

Приклади	Показники	
	% живих клітин	кількість колоній та кластерів на 10 <sup>5</sup> клітин в агарі
1	82,2±3,2	86,4±5,8
2	95,2±2,4	121,3±2,1
3	96,1±3,1	124,2±4,1
4	94,5±2,7	123,2±3,0
5	96,2±2,7	120,4±4,3
6	93,7±1,8	125,7±2,8
7	90,0±3,4	121,5±4,2
8	95,4±1,6	123,0±3,1
9	96,4±2,9	128,0±1,8
10	93,3,1±2,3	121,4±3,3
11	94,2±3,4	120,3±3,7
65 12	95,2±2,3	126,5±4,0

5

10

15

13	88,7±4,8	110,4±5,2
14	90,3±2,1	107,6±3,2
15	85,3±2,0	104,7±2,5
16	84,1±3,4	102,7±5,3
17	87,2±3,4	115,3±2,7
18	88,6±1,2	110,6±3,0
19	91,2±5,1	121,4±2,1
20	90,8±3,7	120,5±1,1
21	89,0±3,5	118,8±3,2
22	88,4±3,0	116,2±1,1
23	87,2±4,2	117,0±3,5
24	85,2±3,1	114,5±1,2

### Формула винаходу

20

1. Склад кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, що передбачає застосування водного розчину хлориду натрію, цукрів та кріопротектора, який відрізняється тим, що як цукри він містить поліглюкін, як кріопротектор - димексид та додатково лізоцим у співвідношенні компонентів розчину, об. %:

25

поліглюкін 6%, рН 4,5-6,0	40-45
хлорид натрію	8-9
лізоцим	0,04-0,05
димексид	4-6
вода бідистильована	решта.

30

2. Склад кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, що передбачає застосування водного розчину хлориду натрію, цукрів та кріопротектора, який відрізняється тим, що як цукри він містить поліглюкін, як кріопротектор - поліетиленоксид м.м. 400 та додатково лізоцим у співвідношенні компонентів розчину, об. %:

35

поліглюкін 6%, рН 4,5-6,0	40-45
хлорид натрію	8-9
лізоцим	0,04-0,05
поліетиленоксид м.м.400	10-20
вода бідистильована	решта.

40

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2003, N 9, 15.09.2003. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

45

50

55

60

65